

## バイオチップ及びその製造方法

### 発明の背景

発明の分野：

- 5 本発明は、生化学上の被検体と特異に反応し、被検体の構造、機能に対する情報を得るために使用されるバイオチップ等に代表される検査機器に用いられ、好ましくは顕微鏡スライドグラス等の基板上に、数百から数万種類以上の異なる種類の被検体を捕捉するキャプチャー、特にDNA断片等を微小スポットとして高密度に整列固定させたDNAマイクロアレイ（DNAチップ）及びその製造方法  
10 に関する。

関連する技術の記述：

近年における遺伝子構造の解析方法の進歩にはめざましいものがあり、ヒトの遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子構造が明らかにされてきている。このような遺伝子構造の解析には、顕微鏡スライドグラス等の基板上に数百から数万種類以上の異なる種類のDNA断片等を微小スポットとして整列固定させたDNAマイクロアレイ（DNAチップ）が用いられるようになってきている。

このDNAマイクロアレイの製造における微小スポットの形成方法としては、QUILL方式、ピン&リング方式、あるいはスプリングピン方式等、ピンを使用し、試料液を基板上に打ち込むものが広く用いられている。

- 20 いずれの方法を採用した場合であっても、各微小スポットの容量と形状のばらつきを低く抑えて、各微小スポット間の距離を一定に保つことが重要となり、更には、基板上に形成された微小スポット中の被検体と特異に反応し、被検体の構造、機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャー（DNAマイクロアレイの場合はDNA断片等に相当する）は、確実に基板上に固定化されることが  
25 必要である。

一方、更なる高密度化に向けて、微小スポットの形状制御性が良好であり、生産性に優れた新しい方法の開発に対する期待も大きい。

ところで、従来のバイオチップの製造においては、DNA断片等を含む試料を基板上に滴下して微小スポットを形成する際や、その後のチップの扱いや処理に

において、該微小スポットが剥がれ落ちるという現象が生じる場合がある。DNA  
マイクロアレイにおけるDNA断片等の基板上への固定化は、DNA断片自体に  
固定用の官能基を付けたり、基板の表面を官能基層でコーティングする手法が採  
用されているが、このような手法を採用しても、微小スポットの剥がれを防止す  
るには不十分である。

また、DNA断片等を含む試料中に親水性ポリマー等を溶解させて、DNA断  
片等の基板上への固定を補強する手法も採用されているが、試料と固定化補強液  
を混合するための工程が必要となり、しかも、固定化補強液も多く必要となるこ  
とからコストアップが懸念される。更に、そのような固定化補強液と試料を予め  
混合して基板上に供給する場合は、数千種以上の試料と1種類の固定化補強液の  
なじみや相溶性を考慮しなければならない、固定化補強液の材料の選択性に制限が  
あった。

更にまた、固定化補強液を含んだ試料は、従来の方法にて基板上に供給しな  
ければならないため、その供給方法にて供給できる物性を有した固定化補強液しか  
使用できないという欠点があった。

具体的には、DNAマイクロアレイの一般的な製造法であるピンを用いた機械  
式のスポット形成法においては、固定化補強液を含んだ試料は、物理的にピンに  
保持（付着）して試料を基板上に移動（供給）させるため、ピンに付着する試料  
でなければならず、またその付着量は、数千種以上のDNA断片等の全ての場合  
になるべく均一になるようにしなければならないため、DNA断片等と混合する  
固定化補強剤の選定は極めて限られたものであった。

一方、微小スポットを精度よく形成する方法として、非接触式スポッティング  
法の一つであるインクジェット式スポッティング法がある。この方法を用いた、  
生体試料を微量、精度よく分注する装置として、圧電／電歪素子をマイクロポン  
プとして使用したマイクロピペット及びこれを用いた分注装置が、開発、実用  
化されている。

この非接触式スポッティング法は、DNA断片や核酸、アミノ酸等を含んだ生  
体試料を微小な液滴として空中に吐出し、スライド基板上に付着させるものであ  
る。

しかしながら、この方法は、各々液物性が微妙に異なる数百から数万種類の比較的粘度の高い生体試料の微小な液滴を空中に吐出し、スライド基板上に付着させるものであるため、吐出時に、目的とする液滴（目的吐出滴）の他に、いわゆるサテライト（目的吐出滴より細かいしぶき状の滴）が発生し易く、それが基板上に付着して、本来のスポット形成位置以外の箇所にスポットを形成させたり、微小スポット間の距離を一定に保つことができずに、相互混入によるコンタミネーションを引き起こす等、得られる製品の品質上問題があった。

このようないわゆるサテライトは、分注装置の運転初期には発生せずに、しばらく運転してから発生することもあり、工程管理上極めて厄介な問題であった。

また、液滴の吐出速度が大きいと、スライド基板上に付着する際に液滴の勢いが大きく、しぶき（飛沫）を発生させて、スポット周りにこの飛沫による不要スポット（これもサテライトと呼ぶ）を発生させる等の問題があった。

このようないわゆるサテライトの発生を防止するためには、吐出速度を小さくすればよいが、吐出速度を小さくすると、吐出が不安定になるという問題があった。

また、上述したDNA断片等を含む試料中に親水性ポリマー等を溶解させて、DNA断片等の基板上への固定を補強する方法をインクジェット式スポッティング法に採用した場合、吐出ノズルを通じて試料溶液を基板上に吐出することになるが、試料溶液を基板上に吐出する際に、試料溶液の固化が進み、吐出不能になるおそれがある。特に、試料に粘度の高い固定化液を混合させて吐出する場合、吐出ノズルの近傍での試料溶液の乾燥固化が原因で吐出不良を引き起こすという問題がある。

また、実際に被検体の構造又は機能に対する情報を得る場合に、被検体がスポット以外の基板上に非特異的に付着する場合が生じる。従来は、このような現象を防止するために、基板上にスポットを形成した後に、ブロッキング処理（基板上のうち、スポットが形成された部分以外の部分に被検体が付着することがないようにする処理）するようにしている。

しかし、このブロッキング処理においては、基板上に供給されたキャプチャーの大半が前記ブロッキング処理の際に流れてしまうという問題があった。

また、ブロッキング処理が不完全で、スポットのシグナルのS/N比が劣化するという問題もあった。

#### 発明の概要

- 5 本発明は、以上のような課題を考慮してなされたものであり、DNA断片等を含む試料の微小スポットの抜けのなく、スポットにシグナルのS/N比が高い高品質なバイオチップを製造でき、製造工程の簡略化、コストの低廉化並びに歩留まりの向上を図ることができるバイオチップ及びその製造方法を提供することを目的とする。
- 10 本発明は、被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャー溶液を複数種類基板上に供給して、基板上にキャプチャー溶液によるスポットが多数配列されたバイオチップにおいて、前記基板は、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質が形成されていることを特徴とする。ここで、
- 15 キャプチャーを含む溶液試料とは、キャプチャーを液体中に溶解、あるいは、分散させた溶液のことであり、キャプチャー溶液を含む試料ともよばれる。
- こうすることにより、キャプチャーの基板上への固定化が強固なものとなり、ブロッキング処理などによってキャプチャーが剥がれ落ちる不具合が回避される。尚、固定化を担う第1の物質は、前期キャプチャーを前期基板上に固定化させる
- 20 固定化液であっても固定化を補強する固定化補強液であってもよい。
- 更に、本発明に係るバイオチップは、被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャーを含む試料を複数種類、基板上に供給して、該基板上にキャプチャーを含む試料によるスポットが多数配列されたバイオチップにおいて、前記基板は、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質が
- 25 形成され、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、少なくとも前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害する第2の物質が形成されていることを特徴とする。これにより、前記第2の物質が形成されていない部分の形状により、前記スポットの形状並びに配列形態が決定されることになる。そのため、

試料を基板上に供給した際に、スポットの配列間隔がばらついたり、スポット同士が付着するなどの不具合は回避され、試料を規定の位置に供給できなかった場合には、第2の物質の存在により、該試料の基板上への付着が防がれるため、汚染源となることはなく、もって解析の際の信頼性、再現性、定量性に優れたバイオチップとなる。

また、試料をインクジェット方式で供給した場合に、試料吐出の際にしばしば発生するサテライト現象による飛沫は、前記第2の物質の存在によって基板への付着が阻害されるため、インクジェット方式にて発生していたサテライトの問題を解消させることができる。

つまり、本発明においては、安価に高品質なバイオチップを得ることができるのである。

そして、前記構成において、前記第2の物質は、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害し、かつ、前記被検体が前記基板上への付着を阻害する物質であることが好ましい。この場合、スポットの形成前において、すでにスポットが形成されるべき部分以外の部分に、被検体が基板上に付着することが阻害される物質が存在しているため、スポットの形成後に、スポット毎にブロッキング処理を行う必要がなくなる。そのため、基板上に固定されるキャプチャーの量を通常のバイオチップに比べ多く確保することができ、結果として、被検体に対する感度が向上する。

また、前記第1の物質を前記基板上の全面に形成し、前記第2の物質を前記基板上に形成された前記第1の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に形成するようにしてもよい。

こうすることで、スポットの形状並びに配列形態を決定する前記第2の物質が形成されていない部分の形状を、第2の物質の形成だけで規定できるため、よりスポットの間隔、個別の形状のバラツキが抑えられたバイオチップが実現され、結果として、被検体に対する感度が揃った精度の解析が可能となる。

そして、本発明は、被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャー溶液を複数種類基板上に供給して、基板上にキャプチャー溶液によるスポットが多数配列されたバイオチップを製造する

バイオチップの製造方法において、キャブチャーを含む溶液試料とキャブチャーを含まない溶液試料とをそれぞれ別々に供給してバイオチップを製造することを特徴とする。この場合、前記キャブチャーを含む溶液試料をインクジェット方式で供給することが好ましい。

5      ここで、キャブチャーを含まない溶液試料とは、その液体中にキャブチャーが存在しない溶液のことをいい、キャブチャー溶液を含まない試料ともよぶ。

キャブチャー溶液を含む試料とキャブチャー溶液を含まない試料とをそれぞれ別々に供給することにより、キャブチャー溶液を含まない試料は、キャブチャーを基板上に確実に固定化、保持するための性能を持つという観点のみから選択でき好ましい。また、キャブチャー溶液を含む試料とキャブチャー溶液を含まない試料とをそれぞれ別々の供給手段にて供給することが可能になるため、それぞれの液に最適な供給法を用いることができる。

その結果、数百種以上になることもあるキャブチャー溶液を含む試料に対し、キャブチャー溶液を含まない試料は通常1種類になることが多く、キャブチャー溶液を含まない試料の供給手段として、簡易で安価、大量処理ができる手段を採用することが可能となる。

キャブチャー溶液を含む試料の供給手段としてインクジェット方式を用いることにより、キャブチャー溶液を含む試料を微量、精度よく基板上に供給できる。また、インクジェット方式は、非接触式の液の供給方式であるため、このようなキャブチャー溶液を含む試料とキャブチャー溶液を含まない試料の2種類以上の液を供給して一つのスポットを形成する場合には最適である。

なぜならば、ごく限られた研究実験を除き、通常、バイオチップの製造は、一度に複数枚以上作製され、同じキャブチャー溶液を含む試料の基板上への供給は、複数の基板にわたり複数回以上行われることになる。この場合、例えばピン式のように基板に接触して試料を供給する場合、ピンの先端はキャブチャー溶液を含む試料とキャブチャー溶液を含まない試料が混合することになり、供給毎にその混合割合が変化し、結果としてバイオチップ毎の各スポットに供給されるキャブチャーの量がばらつく原因となる。インクジェット方式のような非接触式の液の供給方式を採用することによりこのような問題は完全に排除される。

また、インクジェット方式はその吐出量、吐出の勢い（吐出速度）等を電氣的に精度よく制御できるため、意図的に各スポット間にてキャプチャー溶液を含む試料とキャプチャー溶液を含まない試料の割合を変化させることも可能となり品質向上に有利である。

- 5 更に、本発明においては、キャプチャー溶液を含まない試料をインクジェット方式でまたは、スクリーン印刷方式にて基板に供給することが好ましい。インクジェット方式で供給することにより、キャプチャー溶液を含まない試料の供給が、上述したキャプチャー溶液を含む試料の場合と同様に微小量、精度よく、また両液の混合割合がばらつきなく、制御性よく供給できることとなり、パイオチップ
- 10 の品質が向上する。

また、スクリーン印刷方式にて供給することにより、インクジェット式ほど量的、位置的に精度よくはできないが、通常一枚あたり数千スポット程度が形成されたパイオチップでは十分な精度をもった試料の供給が、安価で、素早く、大量に可能になる。

- 15 なお、キャプチャー溶液を含まない試料の供給は、インクジェット方式、スクリーン印刷方式に限ったことではなく、必要に応じてマスク等でパターンニングしてスプレー方式、あるいはディッピング方式等で供給してもよい。

- ここで、前記キャプチャー溶液を含まない試料は、前記キャプチャー溶液を含む試料を前記基板上に固定化させるための固定化液または、固定化を補強するた
- 20 めの固定化補強液とすることができる。

- これにより、まず、キャプチャーを含んだ試料を供給する際に、固定化液も供給することから、予め固定化液を基板上に供給（多くの場合、コーティング）する必要がなく、基板のコストアップを未然に防ぐことができる。更に、固定化液とキャプチャーを含んだ試料との供給が比較的短い時間内に両方とも行われるた
- 25 め、予め固定化液を基板上に供給した場合のように、固定化液の経時変化によるパイオチップの品質のばらつき発生を抑えることができる。

また、試料と固定化補強液とをそれぞれ別々に供給することから試料と固定化補強液とを混合する工程が不要になり、また、固定化補強液の量として、基板上に供給される微量の試料を固定化補強させるために必要なわずかな量で済むこと

から、固定化補強液の量を大幅に減らすことができ、製造工程の簡略化及びコストの低廉化に有利となる。

また、インクジェット方式を採用した場合においては、固定化液または固定化補強液を供給するためのノズルを、キャプチャーを含んだ試料の供給仕様に合わせる必要がなく、専用に設計でき（例えば乾燥しにくい構造等）、設計の自由度を向上させることができる。

しかも、固定化液または固定化補強液が乾燥、固化しやすい液の場合でもキャプチャーを含んだ試料の供給中に試料が固化するということがないため、時間的余裕をもって試料の供給ができる。そのため、キャプチャーを含んだ供給箇所の位置決めや試料の種類に応じた供給タイミング、供給量などを考慮しながら試料や固定化液を供給することができ、バイオチップの品質の向上及び歩留まりの向上を図ることができる。

特に、前記固定化液、あるいは固定化補強液として、前記キャプチャーを含む試料と混合することにより、固定化または、固定化補強が進む液であることが好ましい。この場合、更に時間的余裕をもって試料や固定化液を供給することができ、歩留まりの向上に寄与することとなる。

そして、前記キャプチャーを含む試料と、前記固定化液または前記固定化補強液とをそれぞれ別々に供給する場合、基板上に該固定化液または該固定化補強液を供給した後に、該液が供給された部分に該キャプチャーを含む試料を供給するようにしてもよいし、反対に、基板上に該キャプチャーを含む試料を供給した後に、該キャプチャーを含む試料が供給された部分に該固定化液または該固定化補強液を供給するようにしてもよいし、両者を略同時期に供給してもよい。

固定化液または、固定化補強液を先に基板上に供給することにより、キャプチャーと基板との間に該液が物理的に介在することになり、固定化がより強固なものになる。但し、固定化補強剤の場合は、あくまでも固定化を補強するものであるため、キャプチャーと基板、あるいはキャプチャーと基板上の固定化液との物理的接触を阻害する影響が少ないものがよく、3次元的隙間の多い構造をもつポリマー系の物質がよい。

固定化液または、固定化補強液をキャプチャーを含む試料が供給された後から



供給する場合は、予めキャプチャーを含む試料が精度よく供給された上から該液を供給することになり、固定化液または、固定化補強液の供給に際しては位置精度を厳しく規定する必要がないので、安価に歩留まりを上げることができる。この場合は、キャプチャーが被検体を捕らえることを阻害しないような構造、厚みをもった固定化液または固定化補強液でなければならない。

また、キャプチャーを含む試料と該固定化液または該固定化補強液を略同時期に供給する場合は、供給時間が短縮できて好適である。尚この場合は非接触式の供給方式であるインクジェット方式で可能になる。

前記キャプチャーは、核酸類であることが好ましく、更には、DNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、cDNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、RNAまたはアンチセンスRNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、化学合成されたDNAもしくは増幅されたもの、または、化学合成されたRNAもしくは増幅されたものであることが好ましい。

また、前記キャプチャーは、蛋白質類であることが好ましく、更には、抗原、抗体、レクチン、アドヘシン、生理活性物質の受容体、またはペプチドであることが好ましい。

そして、前記固定化液がポジティブチャージを持った化学物質溶液であり、イオン結合により前記キャプチャーを固定化するもの、即ちアミノプロピルトリエトキシシラン等のシランカップリング剤、ポリ-L-リジン、あるいはポリアルキルアミンであること、あるいは、前記固定化液が基板表面を化学修飾する化学物質であり、基板表面に導入された官能基と前記キャプチャーを修飾して導入した官能基を化学反応させ、共有結合によりキャプチャーと基板を固定化するもの、即ちアミノ基とアルデヒド基、アミノ基とN-ヒドロキシサクシイミド基、アミノ基とカルボキシル基、アミノ基とエポキシ基、チオール基とエポキシ基の反応であるもの、あるいは、前記固定化液がキャプチャーを基板にアフィニティ結合または水素結合を生じさせるもの、即ち、アビジン、ストレプトアビジン、プロタミンあるいはヒストンであるもの、あるいは、前記固定化液がキャプチャーを基板に疎水結合させるもの、即ち、ポリスチレン等の疎水性物質フェニル基、アルキルベンゼン等のアルキル基等の疎水基を含む溶液であることが好ましい。

更に、前記固定化補強液が、保水性物質であること、即ち、コロミン酸、ヒアルロン酸、またはコロミン酸とヒアルロン酸の混合物であること、あるいは、前記固定化補強液が、高分子物質であること、即ち、CM-セルロース、ニトロセルロース、ポリアクリル酸、アルギン酸等の酸性ポリマー、あるいは、ポリエーレンイミン、ポリアクリルアミド等の塩基性ポリマー、あるいは、メチルセルロース、ポリエーレングリコール、ポリプロピレングリコール等の中性ポリマー、または、BSA、卵白アルブミン、リゾチーム等の蛋白質類であることが好ましい。

上記のようなキャプチャー、固定化液、固定化補強液の物質の組合せにより、キャプチャーの基板上への固定化がより強固なものになると共に、本発明の基本的な考えである、キャプチャーを含んだ溶液とキャプチャーを含まない溶液、即ち、固定化液若しくは固定化補強液を別々に基板上に供給する方法と組み合わせることにより、キャプチャーの配向性が揃った、即ち、基板上にキャプチャーが3次的に広がった形態で固定化が進み、キャプチャーが被検体を捕獲しやすくなり、結果として、バイオチップの品質が向上する。

さらには、別々に供給することにより、固定化、固定化補強液の機能が大気中に放置することによる乾燥等の影響による劣化が防止され、上述した物質の本来の機能が保たれて基板上に供給されて好ましい。

更にまた、固定化補強液として、保水性物質を用いることは、スポット内に水分を保つことにより、キャプチャーの基板上への固定化反応を時間をかけて十分に進めることができ、好ましい。

また、固定化補強液として、高分子物質を用いることは固定化補強液中をキャプチャーが自在に移動でき、固体化、あるいは、キャプチャーの被検体の捕捉を妨げないため好ましい。

特に、キャプチャーとしてDNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程と、前記PCR産物を乾燥してDNA粉末とする工程と、前記DNA粉末を緩衝液に溶かす工程とを踏んで調製されることが好ましい。PCR増幅工程を経ることによりDNA断片に固定化を促進する種々の官能基を付加することができ、本発明に好適である。

また、本発明においては、基板が複数枚セットされた治具を備え、キャブチャー溶液を含む試料とキャブチャー溶液を含まない試料との供給を治具上に固定された状態の基板のまま行うことがよい。基板のセットを液の供給毎にセットし直さないことにより、製造コストの低減が可能となる、一方、2液が供給される位置のずれを低減できる利点を合わせもつ。

更に、本発明におけるバイオチップの製造法は、キャブチャー溶液を含まない試料が基板上に供給される領域が、キャブチャー溶液を含む試料が供給される領域と略同一又はキャブチャー溶液を含む試料が供給される領域を含む領域で、且つ領域の形状が略円形であることを特徴とする。

こうすることにより、バイオチップの各キャブチャーが存在するスポット形状が、1種類のキャブチャー溶液を含まない試料のスポット形状により規定されることになり、キャブチャーの種類が異なることによるスポット形状のばらつきをなくすることができる。

また、1種類のキャブチャー溶液を含まない試料を供給することから、供給手段（ピンや、インクジェットの吐出ユニット）も1種類で対応できるため、供給手段が異なることによるスポット形状のばらつきもなくすることができる。更に、バイオチップの各スポット形状の大きさを規定するのが、キャブチャーを含まない試料の供給量であり、キャブチャー溶液を含む試料の供給量より多くできることから、結果としてバイオチップに求められるスポットの大きさを実現するキャブチャー溶液を含む試料の供給量を低減することができる。

これは、現状のバイオチップの製造法では、基板上に供給されるキャブチャー溶液を含む試料の量の殆どが基板上に固定化されず洗い流されてしまうのに対し、本発明においては、キャブチャー溶液を含まない試料によって形成された供給領域までキャブチャー溶液を含む試料が拡散することから、より効率的に基板上に固定化され、固定化されずに洗い流されてしまう量を低減することができる。

更にまた、上記製造法はインクジェット法によりキャブチャー溶液を含む試料を供給する場合に好適である。この場合、上述するようなキャブチャー溶液を含む試料を供給するときにサテライトが発生しても、サテライトは、キャブチャーを含まない試料溶液領域に到達することが殆どなく、また、万一到達しても正規

の試料と一体化するため、結果としてサテライト問題は、殆ど回避できることになる。

この効果はサテライト問題に対してだけではなく、インクジェット方式の場合に発生する可能性のある「吐出方向がばらついてしまう所謂飛行曲がり問題」に

5 対しても同様の効果を発揮して好適である。

更にまた、本発明においては、キャプチャー溶液を含まない試料が基板上に供給される領域が、キャプチャー溶液を含む試料が供給される領域を2つ以上含む大きさであることを特徴とするバイオチップの製造方法としてもよい。この場合、キャプチャー溶液を含まない試料の供給がより簡便となる。

10 次に、本発明に係るバイオチップの製造方法は、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質を有する前記基板上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、少なくとも前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害する第2の物質を形成する工程を有することを特徴とする。

15 これにより、予めスポッティングされるべき箇所には第1の物質、それ以外の箇所には第2の物質が形成された基板を用いてキャプチャーを含む溶液を基板上にスポッティングすることとなり、前記第2の物質が形成されていない部分の形状により、前記スポットの形状並びに配列形態が決定されることになり、スポットの配列間隔がばらついたり、スポット同士が付着するなどの不具合は生じなくなるとともに、試料を規定の位置に供給できなかった場合には、第2の物質の存在により、該試料の基板上への付着が回避されるため、汚染源となることはない。また、試料をインクジェット方式で供給した場合に、試料吐出の際にしばしば発生するサテライト現象による飛沫は、前記第2の物質の存在によって基板への付着が阻害されるため、インクジェット方式にて発生していたサテライトの問題を解消させることができる。以上のような利点があり、高品質なバイオチップを製造でき、製造工程の簡略化、コストの低廉化並びに歩留まりの向上を図ることができる。

20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
25 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
そして、前記製造方法において、前記基板上のうち、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記第1の物質を形成する工程と、前記基板上のうち、

前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成する工程とを有するようにしてもよい。第1の物質を形成する工程と第2の物質を形成する工程とを有することによって、それぞれの物質の相性を加味しながら材料選定が出来ると共に、形成するタイミングを個別に調整でき、各々の物質の特性を

5 最大限に引き出すことが可能になる。

また、前記製造方法において、前記基板上の全面に前記第1の物質を形成する工程と、前記基板上に形成された前記第1の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成する工程とを有するようにしてもよい。第1の物質を全面に形成することにより、よりコストを抑えた大量生産の工程が採用できる。

10 また、前記製造方法において、前記基板として、予め前記スポットが形成されるべき箇所に、前記第1の物質が形成された基板を用い、前記基板上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成する工程とを有するようにしてもよい。

15 前記第2の物質は、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害し、かつ、前記被検体が前記基板上への付着を阻害する物質であることが好ましい。

また、前記キャプチャーを含む試料をインクジェット方式で供給するようにしてもよい。この場合、試料の供給を高速で、かつ、効率よく行うことができる。しかも、試料の供給が、供給手段が基板と接触しない非接触方式であるため、予め基板上に形成してある第2の物質が試料の供給手段に混入してコンタミネーションを起こすという問題を回避することができる。

20 試料をインクジェット方式で供給した場合に、供給は高速で実現できるが、試料吐出の際にしばしばサテライト現象が発生して基板が汚染されることになる場合があるが、サテライト現象による飛沫は、前記第2の物質の存在によって基板への付着が阻害されるため、インクジェット方式にて発生していたサテライトの問題を解消させることができる。従って、インクジェット方式による試料の供給を積極的に促進させることができる。

25 また、前記製造方法において、前記第1の工程は、前記基板上の全面に前記第1の物質を形成する処理を含み、前記第2の工程は、前記基板上に形成された前

記第1の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成する処理を含むようにしてもよい。

この場合、前記第2の物質をインクジェット方式で供給するようにしてもよい。

前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成する場合に、位置精度、厚み精度共に良好とすることができ、スポットが形成されるべき部分とスポットが形成されるべき箇所以外の部分との境界を形状的に明確に区別させることができる。しかも、第2の物質の供給を無駄なく効率よく行うことができ、製造コストの低廉化に寄与させることができる。

また、前記第2の物質をスクリーン印刷法で形成するようにしてもよい。この場合、スポットが形成されるべき箇所以外の部分への第2の物質の供給時間を短縮することができ、スループットの向上及び工数の削減化を図ることができる。

また、前記第2の物質をディッピング法で形成するようにしてもよい。この場合、前記基板上に形成された前記第1の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所に、レジストを形成し、前記レジストを含む全面に前記第2の物質をディッピング法で形成し、前記レジストをリフトオフして、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成するようにしてもよい。

このディッピングによる方法は、第2の物質が粘度の低い場合に好適であり、この場合も、スポットが形成されるべき箇所以外の部分への第2の物質の供給時間を短縮することができ、スループットの向上及び工数の削減化を図ることができる。

そして、前記第1の物質が、ポジティブチャージを有する化学物質であって、イオン結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合においては、第2の物質として、ネガティブチャージを有する化学物質とする。

この場合、前記第1の物質は、少なくともアールアールアミノプロピルトリエトキシシラン等のシランカップリング剤、ポリーレーリジン、ポリエチレンイミン、あるいはポリアルキルアミンを含み、前記第2の物質は、少なくともコハク酸、グルコン酸、グリコール酸、リンゴ酸、アクリル酸等の有機酸類、あるいはポリアクリル酸、ポリ乳酸、デキストラン硫酸、ポリグリコール酸等の合成高分子酸類、あるいはアルギン酸、ポリガラクトuron酸、ヒアルロン酸、コンドロイチ

ン硫酸等の天然高分子酸類を含むことが好ましい。

尚、第1の物質が、ポジティブチャージを有する化学物質であり、第2の物質が、ネガティブチャージを有する化学物質であるという組み合わせは、キャプチャーがネガティブチャージを有しイオン結合により基板への固定化を行なう場合に  
5 おいては好適に採用されるが、キャプチャーがネガティブチャージを有しない場合は、第1の物質が、ネガティブチャージを有する化学物質であり、第2の物質が、ポジティブチャージを有する化学物質の組み合わせであっても良い。

また、前記第1の物質が、活性化基を有し、基板表面を修飾する化学物質であって、基板表面に導入された活性化基と前記キャプチャーを修飾して導入した官能基とを化学反応させ、共有結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合においては、前記第2の物質として、活性化基と反応する官能基を有する化学物質とする。

この場合、前記共有結合を達成する化学反応は、アミノ基とアルデヒド基との反応、アミノ基とN-ヒドロキシサクシニミド基との反応、アミノ基とカルボキシ基との反応、アミノ基とエポキシ基との反応、又は、チオール基とエポキシ基との反応である。

そして、前記第1の物質は、少なくとも $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランとグルタルアルデヒドとの混合物、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランと無水コハク酸とN-ヒドロキシサクシニミドとの混合物、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランと無水コハク酸との混合物、エピクロロヒドリン、あるいはビスオキシランを含み、前記第2の物質は、少なくともグリシン等のアミノ酸類、アミノ基を有するトリス、エタノールアミン、チオール基を有するシステイン、グルタチオン、あるいはチオブライコールを含むことが好ましい。

また、前記第1の物質が、基板表面を修飾する化学物質であって、アフィニティ結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合においては、前記第2の物質は、該化学物質とアフィニティ結合する物質とする。

この場合、前記第1の物質は、少なくともアビジン、ストレプトアビジン、プロタミン、ヒストン、ビオチン、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体を含み、前記第2の物質は、少なくともアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、核

酸、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体を含むことが好ましい。

また、前記第1の物質が、スチレン基、フェニル基、アルキル基等の疎水基を含み、基板表面を修飾する化学物質であって、疎水結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合においては、前記第2の物質は、少なくとも両親媒

5 性物質を含むこととする。

この場合、前記第1の物質は、少なくともポリスチレンあるいはアルキルベンゼンを含み、前記第2の物質は、少なくともゼラチンあるいはカゼインを含むことが好ましい。

また、前記第2の物質は、シリコンあるいはフッ素等を含む撥水性を有する物質よりなるが好ましい。一般にキャプチャーを含む試料のような生体物質は水溶液である場合が多く、第2の物質として撥水性、或いは疎水性をもつ物質が選択されることにより、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害する効果がより増加されるとともに、バイオチップの使用時において用いられるサンプル液（被検体を含む試料溶液）も水溶液である場合が多く、その場合、スポット以外の第2の物質が形成されている個所との排斥力によりスポット以外の個所へのサンプルの非特異吸着が効果的に抑えられ、もってスポットのシグナルのS/N比が向上する。

そして、前記キャプチャーを核酸類としてもよい。この場合、核酸類としては、DNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、cDNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、RNA又はアンチセンスRNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、化学合成されたDNAもしくは増幅されたもの、又は、化学合成されたRNAもしくは増幅されたものが挙げられる。

また、前記キャプチャーを蛋白質類としてもよい。この場合、蛋白質類としては、抗原、抗体、レクチン、アドヘシン、生理活性物質の受容体、又はペプチドが挙げられる。

添付した図面と協同する次の好適な実施の形態例の説明から、上記の目的及び他の目的、特徴及び利点がより明らかになるであろう。

図面の簡単な説明



図1は、第1の実施の形態に係るバイオチップの製造方法を示す工程ブロック図である。

図2は、試料調製工程の内訳を示す工程ブロック図である。

図3は、製造されるバイオチップを示す斜視図である。

5 図4Aは、基板上に固定化補強液を供給した状態を示す工程図である。

図4Bは、基板の固定化補強液上に試料を供給した状態を示す工程図である。

図4Cは、試料と固定化補強液が一体化した状態を示す工程図である。

図5Aは、第1の実施の形態に係るバイオチップの製造方法で使用される分注装置の構成を示す平面図である。

10 図5Bは、その正面図である。

図5Cは、分注装置を構成する1つのマイクロピペットを示す拡大平面図である。

図6は、マイクロピペットの構成を示す縦断面図である。

15 図7は、マイクロピペットの基体内に形成されるキャビティを含む流路の形状を示す斜視図である。

図8は、分注装置を使用してバイオチップを製造する方法の一例を示す説明図である。

図9Aは、基板上に試料を供給した状態を示す工程図である。

図9Bは、基板の試料上に固定化補強液を供給した状態を示す工程図である。

20 図9Cは、試料と固定化補強液が一体化した状態を示す工程図である。

図10Aは、基板上に固定化液を供給した状態を示す工程図である。

図10Bは、基板の固定化液上に試料を供給した状態を示す工程図である。

図11Aは、基板上に固定化補強液を供給した状態を示す工程図である。

図11Bは、基板の固定化補強液上に試料を供給した状態を示す工程図である。

25 図11Cは、試料と固定化補強液が一体化した状態を示す工程図である。

図12は、第5の実施の形態に係るバイオチップを示す斜視図である。

図13は、第5の実施の形態に係るバイオチップを示す拡大断面図である。

図14Aは、基板本体の上面に第1の物質を形成した状態を示す工程経過図である。

図 1 4 B は、第 1 の物質上のうち、スポットが形成されるべき箇所以外の部分に第 2 の物質を形成した状態を示す工程経過図である。

図 1 5 は、分注装置を使用してバイオチップを製造する方法の一例を示す説明図である。

図 1 6 A は、基板本体上に形成された第 1 の物質上のうち、スポットが形成されるべき部分にレジストを形成した状態を示す工程経過図である。

図 1 6 B は、レジストを含む全面に第 2 の物質を形成した状態を示す工程経過図である。

図 1 6 C は、レジストをリフトオフした状態を示す工程経過図である。

### 好ましい実施の形態例の記述

以下、本発明に係るバイオチップ及びその製造方法の実施の形態例を図 1 ～図 1 6 C を参照しながら説明する。

まず、第 1 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法は、図 1 に示すように、基板 1 0 の表面に poly-L-lysine 層 1 2 (図 4 A ～図 4 C 参照) を形成する前処理工程 S 1 と、DNA 断片を含む試料を調製する試料調製工程 S 2 と、基板 1 0 上に固定化補強液を供給 (滴下を含む) する第 1 の供給工程 S 3 と、試料調製工程 S 2 において得られた試料を基板 1 0 上に供給された固定化補強液上に供給 (滴下を含む) して図 3 に示すバイオチップ 2 0 を製造する第 2 の供給工程 S 4 とを有する。

また、試料調製工程 S 2 は、図 2 に示すように、DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する増幅工程 S 1 1 と、得られた PCR 産物を乾燥して DNA 粉末とする粉末生成工程 S 1 2 と、得られた DNA 粉末を緩衝液に溶かす混合工程 S 1 3 とを含む。

具体的に説明すると、前処理工程 S 1 は、まず、基板 1 0 をアルカリ溶液に浸し、室温で少なくとも 2 時間ゆっくりと振盪する。前記アルカリ溶液は、例えば NaOH を蒸留水に溶かし、更にエタノールを加えて、完全に透明になるまで攪拌した溶液である。

その後、基板 1 0 を取り出して、蒸留水中に移し、リンスして、アルカリ溶液

を除去する。次いで、蒸留水中に poly-L-lysine を加えて調製された poly-L-lysine 液に基板 10 を浸し、1 時間放置する。

その後、基板 10 を取り出して、遠心機にかけて遠心し、余分な poly-L-lysine 液を除去する。次いで、基板 10 を 40℃、5 分ほど乾燥させて、表面

5 に poly-L-lysine 層 12 が形成された基板 10 を得る。

次に、試料調製工程 S2 は、まず、既知の PCR 機で増幅した PCR 産物（増幅工程 S11）に、3 M sodium acetate とイソプロパノールとを加え、数時間放置する。その後、この PCR 産物溶液を遠心機で遠心し、DNA 断片を沈殿させる。

10 沈殿させた DNA 断片をエタノールでリンスし、遠心の後、乾燥させて DNA 粉末を生成する（粉末生成工程 S12）。得られた DNA 粉末に TE バッファー液を加え、数時間放置して完全に溶かすことによって（混合工程 S13）、試料が調製される。この段階での試料の濃度は 0.1 ~ 10  $\mu\text{g}/\mu\text{リットル}$  である。

そして、この実施の形態では、図 4A に示すように、基板 10 上に固定化補強液 16 を供給し（第 1 の供給工程 S3）、次いで、図 4B に示すように、試料調製工程 S2 で得られた試料 14 を基板 10 上に供給されている固定化補強液 16 上に供給することによって、図 3 に示すパイオチップ 20 を製造する（第 2 の供給工程 S4）。なお、試料 14 の供給領域は、供給量を調整することにより、固定化補強液 16 の供給されている領域よりも小さくする。ところで、試料 14 の種類によっては、試料 14 を希釈するようにしてもよい。また、固定化補強液 16 としては、有機ポリマーを使用する。試料 14 は、供給後速やかに、固定化補強液 16 中を拡散し、図 4C に示すように固定化補強液 16 で規定された領域中に均等に分散される。

特に、この実施の形態では、第 1 の供給工程 S3 及び第 2 の供給工程 S4 に、  
25 図 5A に示すような分注装置 30 を使用する。

この分注装置 30 は、矩形の固定板 32 の上面に例えば 10 個のマイクロピペット 34 を 5 行 2 列に配列し、各列方向に整列されたマイクロピペット 34 群をそれぞれ固定治具 36 を介して固定板 32 に固定させた構成を有する。

マイクロピペット 34 は、図 5C 及び図 6 に示すように、ほぼ直方体の形状を

有する基体50の上面に形成された試料注入口52と、該基体50の下面に形成された試料吐出口54と、内部に試料注入口52と試料吐出口54との間に形成されたキャビティ56と、基体50を振動させたり、キャビティ56の体積を変化させたりするアクチュエータ部58とを有して構成されている。

- 5 従って、図6に示すように、前記固定板32には、マイクロピペット34の試料吐出口54に対応する箇所それぞれ貫通孔40が設けられている。これにより、マイクロピペット34の試料吐出口54から吐出された試料14や固定化補強液16が、前記貫通孔40を通じて、例えば固定板32の下方に固定された基板10に供給されることになる。

- 10 このマイクロピペット34は、試料注入口52から基体50の内部にかけて開口幅の大きいほぼL字状の導入穴60が形成されている。この導入穴60とキャビティ56との間には、径の小さい第1の連通孔62が形成され、試料注入口52から注入された試料14や固定化補強液16が導入穴60及び第1の連通孔62を通じてキャビティ56に導入されるようになっている。

- 15 キャビティ56のうち、前記第1の連通孔62とは異なる位置に、試料吐出口54に連通し、かつ、第1の連通孔62よりも径の大きい第2の連通孔64が形成されている。本実施の形態では、キャビティ56の下面のうち、試料注入口52寄りに第1の連通孔62を形成し、同じくキャビティ56の下面のうち、試料吐出口54に対応した位置に第2の連通孔64を形成するようにしている。

- 20 更に、この実施の形態では、基体50のうち、キャビティ56の上面が接する部分が薄肉とされ、外部応力に対して振動を受けやすい構造となっており、振動部66として機能するようになっている。

基体50は、複数枚のジルコニアセラミックスのグリーンシートを積層し、一体焼成して構成されている。

- 25 つまり、基体50は、試料注入口52を構成する窓部が形成され、一部において導入穴60の一部及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された層と、導入穴60の一部及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された層と、第2の連通孔64の一部を構成する窓部が形成された層とを積層し、一体焼成して構成されている。

アクチュエータ部58は、基体50と同様に、一部において第1の連通孔62及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された層と、キャピティ56が形成された層と、振動部66を形成する層とが、積層、一体焼成されたジルコニアセラミックスからなるベース46と、該振動部66上に直接形成された下部電極70と、該下部電極70上に形成された圧電／電歪層や反強誘電体層等の圧電体層72と、該圧電体層72の上面に形成された上部電極74とを有して構成されている。

下部電極70と上部電極74は、図5Cに示すように、それぞれ前記ベース46の上面に形成された複数のパッド76及び78を通じて図示しない駆動回路に電気的に接続される。

試料吐出口54を形成したノズルシート48は、樹脂フィルムにエキシマレーザー加工にて、試料吐出口54を形成している。

上記のような構成のマイクロピペット34によれば、上部電極74と下部電極70との間に電界が生じると、圧電体層72が変形し、それに伴って振動部66が変形し、振動部66に接しているキャピティ（加圧室）56の容積が減少することになる。

このキャピティ56の容積の減少によってキャピティ56内に充填された試料14や固定化補強液16がキャピティ56に連通する試料吐出口54から所定速度で吐出され、図3に示すように、マイクロピペット34から吐出された試料14や固定化補強液16が顕微鏡スライドガラス等の基体50上に微小スポット80として整列固定されたバイオチップ20を作製することができる。

なお、アクチュエータ部58の駆動によって、キャピティ56の容積が減少する構造としては、いわゆるインクジェット方式の装置構造を採用することができる（特開平6-40030号公報参照）。

そして、キャピティ（加圧室）56は、DNA断片などを含む試料14が移動するような流路寸法に形成されている。

つまり、キャピティ56の寸法は、試料14の種類、作製する液滴の大きさ、形成密度により異なるが、例えば、塩基対1～10000程度のDNA断片を0.3μg/μリットルの濃度で×緩衝液（TEバッファ）に分散させた試料14を

数百 $\mu\text{m}$ ピッチで百数十 $\mu\text{m}$ の液滴径の供給を行う場合においては、図7に示すように、キャピティ長(L)は、1~5mm、キャピティ幅(W)は、0.1~1mm、キャピティ深さ(D)は、0.1~0.5mmが好ましい。またキャピティ56の内壁には、流れを乱す突起物がないように滑らかであることがよく、

5 その材質は、試料14と親和性のよいセラミックスからなることが好ましい。

このような形状にすることにより、キャピティ56を試料注入口52から試料吐出口54に至る流路の一部として、試料注入口52から導入穴60、第1の連通孔62を経てキャピティ56内に移動する試料14や固定化補強液16の流れを乱すことなく試料吐出口54に導くことができる。

10 ところで、図5Aに示すように、固定板32の上面には、マイクロピペット34を位置決め固定するための複数のピン38が設けられている。マイクロピペット34を固定板32上に固定する場合は、マイクロピペット34の基体50の両側に設けられた位置決め用孔90(図5C参照)に固定板32のピン38を挿入させながら、マイクロピペット34を固定板32に載置することで、自動的に複数のマイクロピペット34が所定の並びで配列位置決めされることになる。

15 また、各固定治具36は、複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付ける押さえ板100を有する。押さえ板100の両端には、それぞれネジ102が挿通される挿通孔が形成され、この挿通孔にネジ102を挿通して、固定板32にねじ込むことによって、前記押さえ板100で複数のマイクロピペット34を一度に固定板32に押さえ付けることができるようになっている。そして、

20 1つの押さえ板100で押さえ付けた複数のマイクロピペット34で1つのユニットが構成される。図5Aに示すように列方向に配列された5つのマイクロピペット34で1つのユニットが構成されている。

また、押さえ板100には、複数のマイクロピペット34を押さえ付けたときに、各マイクロピペット34の試料注入口52に対応する箇所それぞれ試料14や固定化補強液16を供給するための導入孔104(図5B参照)が形成されており、各導入孔104の上端部にはそれぞれ試料14や固定化補強液16を導入孔104に導くためのチューブ106が保持されている。

なお、押さえ板100の幅は、配線作業の効率化を考慮すると、複数のマイク

ロビペット 3 4 を固定板 3 2 に押さえ付けた際に、アクチュエータ部 5 8 の各電極 7 0 及び 7 4 につながるパッド 7 6 及び 7 8 が上方に臨むような寸法であることが好ましい。

このように、上述の分注装置 3 0 は、試料注入口 5 2 及び試料吐出口 5 4 を有するマイクロピペット 3 4 の複数個をそれぞれ試料吐出口 5 4 を下方向に向けた状態で立設させて構成されている。

即ち、各マイクロピペット 3 4 は、それぞれの試料注入口 5 2 を上側とし、試料吐出口 5 4 を下側とし、かつ、各試料吐出口 5 4 が縦横に配列配置されて、試料吐出口 5 4 からそれぞれ種類の異なる試料 1 4 や固定化補強液 1 6 が吐出されるようになっている。

尚、図 5 A では、押さえ板 1 0 0 の両端をネジ 1 0 2 で固定板 3 2 に締め付けることで固定しているが、押さえ板 1 0 0 の固定法は、ネジ、バネ等で機械的に行うほか、接着剤等で行ってもよい。

また、マイクロピペット 3 4 を構成する基体 5 0 及びアクチュエータ部 5 8 のベース 4 6 部分は、上述したように、セラミックスで形成されており、例えば、安定化ジルコニアや部分安定化ジルコニア、アルミナ、マグネシア、窒化珪素等を用いることができる。

このうち、安定化／部分安定化ジルコニアは、薄板においても機械的強度が大きいこと、靱性が高いこと、圧電体層 7 2 や電極材との反応性が小さいことから最も好適に採用される。

そして、アクチュエータ部 5 8 のベース 4 6 部分等の材料として安定化／部分安定化ジルコニアを使用する場合には、少なくとも、圧電体層 7 2 が形成される部分（振動部 6 6）には、アルミナあるいはチタニア等の添加物が含有されることが好ましい。

また、アクチュエータ部 5 8 を構成する圧電体層 7 2 は、圧電セラミックスとして、例えば、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛、マグネシウムニオブ酸鉛、マグネシウムタンタル酸鉛、ニッケルニオブ酸鉛、亜鉛ニオブ酸鉛、マンガンニオブ酸鉛、アンチモンスズ酸鉛、マンガンタングステン酸鉛、コバルトニオブ酸鉛、チタン酸バリウム等やこれらのいずれかを組み合わせた成分を含有する複合セラミック

スを用いることができるが、本実施の形態においては、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる成分を主成分とする材料が好適に用いられる。

- これは、このような材料が、高い電気機械結合係数と圧電定数を有することに  
5 加え、圧電体層 7 2 の焼結時における基体材料との反応性が小さく、所定の組成のものを安定に形成することができることに基づくからである。

- 更に、本実施の形態では、前記圧電セラミックスに、ランタン、カルシウム、ストロンチウム、モリブデン、タングステン、バリウム、ニオブ、亜鉛、ニッケル、マンガン、セリウム、カドミウム、クロム、コバルト、アンチモン、鉄、イ  
10 ットリウム、タンタル、リチウム、ビスマス、スズ等の酸化物、もしくはこれらいずれかの組合せ、又は他の化合物を適宜、添加したセラミックスを用いてもよい。

- 例えば、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛を主成分とし、これにランタンやストロンチウムを含有するセラミックスを用いることもまた好  
15 ましい。

- 一方、アクチュエータ部 5 8 における上部電極 7 4 及び下部電極 7 0 は、室温で固体であって導電性の金属で構成されていることが好ましく、例えば、アルミニウム、チタン、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、パラジウム、ロジウム、銀、スズ、タンタル、タングステン、  
20 イリジウム、白金、金、鉛等の金属単体あるいはこれらのいずれかを組み合わせた合金が用いられ、更に、これらに圧電体層 7 2 やベース 4 6 部分と同じ材料を分散させたサーメット材料を用いてもよい。

- また、ノズルシート 4 8 は、一般的に吐出口の形成に適した材料からなることが好ましく、PET、ポリイミド、ポリアミド、マレイミド、ポリサルフォン等  
25 の樹脂で構成されていることが望ましく、溶液の吐出する側は、フッ素樹脂やシリコンで撥液処理がなされていることが、液滴を安定して吐出するのによい。本実施の形態では、エキシマレーザ加工性に優れ、生産性に優れたシリコンコーティング済みPETフィルムを好適に採用できる。

更に、型を使った打ち抜き、絞り加工等に優れたSUS等の金属シートからな



るノズルシートを用いても良く、この場合も溶液の吐出する側は、フッ素樹脂やシリコンで撥液処理がなされていることが、液滴を安定して吐出するのによい。

次に、この分注装置 30 を使って基板 10 上に試料を供給する方法の一例について図 8 を参照しながら詳しく説明する。

図 8 に示すように、表面に poly-L-lysine 層 12 をコーティングしたスライドガラス基板 10 を複数枚、例えば 20 枚のガラス基板 10 を、ガラス固定治具 110 に固定する。次に、このガラス固定治具 110 と相対位置制御しながら、ガラス基板 10 上を自在に移動できるようにロボットに取り付けられた分注装置 30 の各チューブ（図示せず）からそれぞれ固定治具 36 の導入孔 104 を介して各マイクロピペット 34 のキャビティ 56 内に固定化補強液 16 を充填し、アクチュエータ部 58 を駆動させて、図 4 A に示すように、基板 10 上に固定化補強液 16 を吐出供給させる。

この場合、図 5 A に示す 10 個のマイクロピペット 34 を全て用いて固定化補強液 16 を供給してもよいが、供給領域の形状の安定性を優先し、1 個のマイクロピペット 34 を用いて全ての供給を行う。

次いで、予めマイクロピペット 34 内を脱泡した純水等の置換液で充填した別の分注装置 30 を用意し、試料 14 を試料注入口 52 から注入した後、アクチュエータ部 58 を駆動させ置換液を吐出排出し、試料 14 を試料注入口 52 からキャビティ 56 内に置換させる。

置換が完了した段階で、アクチュエータ部 58 を駆動させて、図 4 B に示すように、試料 14 を同じガラス固定治具にセットした基板 10 上に供給されている固定化補強液 16 上に吐出供給させる。このようにして、図 4 C に示すように、基板 10 上に固定化補強液 16 を含んだ試料 14 が供給されたバイオチップ 20 が作製される。

次に、本発明に係るバイオチップの製造方法の他の実施の形態例を図 9 A ～図 11 C を参照しながら説明する。

第 2 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法は、図 9 A ～図 9 C に示すように、上述した第 1 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法とほぼ同様に、使用する試料 14、基板 10、分注装置 30 は同じであるが、基板 10 上に液を

供給する順序を固定化補強液 16 と試料 14 で逆転している点で異なる。

即ち、まず、図 9 A に示すように、最初に試料 14 を供給し、その後、図 9 B に示すように、試料 14 が供給された領域に固定化補強液 16 を重ねて供給し、図 9 C に示すように、一体化するようにしている。

この第 2 の実施の形態においては、固定化補強液 16 が、試料 14 中を拡散し、基板 10 まで到着しなければならないという物性が要求されることから、比較的重合度が低いポリマーまたは、モノマーを好適に採用することができる。

次に、第 3 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法は、図 10 A 及び図 10 B に示すように、上述した第 1 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法とほぼ同様に、使用する試料 14、基板 10、分注装置 30 は同じであるが、基板 10 上に固定化液 18 を供給した後、その領域に試料 14 を供給した点で異なる。

即ち、まず、図 10 A に示すように、基板 10 上に、最初に固定化液 18 を供給し、その後、図 10 B に示すように、固定化液 18 が供給された領域に試料 14 を重ねて供給する。

この第 3 の実施の形態においては、固定化液 18 を供給した領域以外は、たとえ試料 14 が供給されても基板 10 上に固定化されることはない。固定化液 18 としては、蒸留水中に **poly-L-lysine** を加えて調製された **poly-L-lysine** 液を採用した。

次に、第 4 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法は、図 11 A ~ 図 11 C に示すように、基板 10 上に固定化補強液 16 を、試料 14 を供給する領域を 2 つ以上含んだ領域にかけて供給し、その後、その上に試料 14 を供給した点で異なる。

即ち、まず、図 11 A に示すように、基板 10 の略全面に固定化補強液 16 をスクリーン印刷法にて形成した後、図 11 B に示すように、これまでの例と同様に、インクジェット法にて試料 14 を供給する。その後、図 11 C に示すように、試料 14 を供給した領域付近で、固定化補強液 16 と試料 14 とが一体化して基板 10 上に強固に固定化される。

このように、第 1 ~ 第 4 の実施の形態に係るバイオチップの製造方法においては、DNA 断片を含む試料 14 と該試料 14 を確実に固定化するための固定化補

強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 とをそれぞれ別々に供給してバイオチップ 2 0 を製造するようにしたので、固定化が確実なものとなり、微小スポットが剥がれ落ちるという現象が激減する。

更に、試料 1 4 と固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 とを混合する工程が不要になり、また、固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 の量として、基板 1 0 上に供給される微量の試料 1 4 を固定化させるために必要なわずかな量で済むため、固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 の量を大幅に減らすことができ、製造工程の簡略化及びコストの低廉化に有利となる。

また、固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 を供給するための分注装置 3 0 における試料吐出口 5 4 を、試料 1 4 の供給仕様に合わせる必要がなく、固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 専用に設計でき（例えば乾燥しにくい構造等）、設計の自由度を向上させることができる。

しかも、供給中に試料 1 4 が固化するということがないため、時間的余裕をもって試料 1 4 や固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 を供給することができる。そのため、供給箇所の位置決めや試料 1 4 の種類に応じた供給タイミング、供給量などを考慮しながら試料 1 4 や固定化補強液 1 6 若しくは固定化液 1 8 を供給することができ、バイオチップ 2 0 の品質の向上及び歩留まりの向上を図ることができる。

次に、第 5 の実施の形態に係るバイオチップ 1 1 0 は、図 1 2 に示すように、被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャーを含む試料を複数種類、基板 1 1 2 上に供給して、該基板 1 1 2 上にキャプチャーを含む試料によるスポット 1 8 0 が多数配列されて構成されている。

基板 1 1 2 は、図 1 3 に示すように、顕微鏡スライドガラス等からなる基板本体 1 1 4 と、該基板本体 1 1 4 の上面に形成され、キャプチャーの基板 1 1 2 上への固定化を担う第 1 の物質 1 1 6 と、該第 1 の物質 1 1 6 上のうち、スポット 1 8 0 が形成されるべき箇所以外の部分に形成され、少なくともキャプチャーの基板 1 1 2 上への固定化を阻害する第 2 の物質 1 1 8 とを有して構成されている。

特に、この第 2 の物質 1 1 8 は、キャプチャーの基板 1 1 2 上への固定化を阻

害し、かつ、前記被検体の基板 1 1 2 上への付着を阻害する物質にて構成されている。

ここで、キャプチャーとしては、核酸類あるいは蛋白質類が挙げられる。核酸類とした場合は、例えば DNA 及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、 c  
5 DNA 及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、 RNA 又はアンチセンス RNA 及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、化学合成された DNA もしくは増幅されたもの、又は、化学合成された RNA もしくは増幅されたものが挙げられる。

一方、蛋白質類として場合は、抗原、抗体、レクチン、アドヘシン、生体活性  
10 物質の受容体、又はペプチド等が挙げられる。

次に、第 1 の物質 1 1 6 及び第 2 の物質 1 1 8 について説明する。まず、第 1  
の物質 1 1 6 が、ポジティブチャージを有する化学物質であって、イオン結合に  
よりキャプチャーの基板への固定化を担う場合においては、第 2 の物質 1 1 8 は、  
ネガティブチャージを有する化学物質とする。

この場合、第 1 の物質 1 1 6 は、 $\gamma$ - $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン  
等のシランカップリング剤、ポリーレーリジン、ポリエチレンイミン、あるいは  
15 ポリアルキルアミンであり、第 2 の物質 1 1 8 は、コハク酸あるいはポリアクリル酸である。

また、第 1 の物質 1 1 6 が、活性化基を有し、基板 1 1 2 の表面を修飾する化  
20 学物質であって、基板 1 1 2 の表面に導入された活性化基と前記キャプチャーを  
修飾して導入した官能基とを化学反応させ、共有結合によりキャプチャーの基板  
1 1 2 への固定化を担う場合においては、第 2 の物質 1 1 8 として、活性化基と  
反応する官能基を有する化学物質とする。

この場合、前記共有結合を達成する化学反応は、アミノ基とアルデヒド基との  
25 反応、アミノ基と N-ヒドロキシサクシイミド基との反応、アミノ基とカルボキ  
シル基との反応、アミノ基とエポキシ基との反応、又は、チオール基とエポキシ  
基との反応である。

そして、このような場合において、第 1 の物質 1 1 6 は、 $\gamma$ -アミノプロピル  
トリエトキシシランとグルタルアルデヒドとの混合物、 $\gamma$ -アミノプロピルトリ

エトキシシランと無水コハク酸とN-ヒドロキシサクシニミドとの混合物、 $\gamma$ -アミノプロピトリエトキシシランと無水コハク酸との混合物、エピクロロヒドリン、あるいはビスオキシシランであり、第2の物質118は、アミノ酸類であるグリシン、アミノ基を有するトリス、エタノールアミン、チオール基を有するシステイン、グルタチオン、あるいはチオブライコールである。

また、第1の物質116が、基板112の表面を修飾する化学物質であって、アフィニティ結合によりキャプチャーの基板112への固定化を担う場合においては、第2の物質118は、キャプチャーと同じ該化学物質とアフィニティ結合する物質とする。

この場合、第1の物質116は、アビジン、ストレプトアビジン、プロタミン、ヒストン、ピオチン、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体であり、第2の物質118は、アビジン、ストレプトアビジン、ピオチン、核酸、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体である。

また、第1の物質116が、ステレン基、フェニル基、アルキル基等の疎水基を含み、基板112の表面を修飾する化学物質であって、疎水結合によりキャプチャーの基板112への固定化を担う場合においては、第2の物質118は、両親媒性物質である。

この場合、第1の物質116は、ポリスチレンあるいはアルキルベンゼンであり、第2の物質118は、ゼラチンあるいはカゼインである。

また、上記にあげた全ての第1の物質116に対して、第2の物質118は、シリコン、あるいはフッ素を含む樹脂である。シリコン、あるいはフッ素を含む樹脂は、水溶液に対して撥液性であるため、第1の物質が基板上に接触することを効果的に防ぎ固定化しなくなることに追加して、パイオチップ使用時においてサンプル液自体をはじく効果もあり、スポットのシグナルに対するバックグラウンドノイズが1/2以下に低減された。

次に、この第5の実施の形態に係るパイオチップ110の製造方法について図14～図16Cを参照しながら説明する。

まず、図14Aに示すように、基板本体114上の全面に第1の物質116をスクリーン印刷法などによって形成する。もちろん、基板本体114として予め

上面に第1の物質116が形成されたものを使用するようにしてもよい。

次に、図14Bに示すように、基板本体114上に形成された第1の物質116上のうち、スポット180が形成される箇所以外の部分に第2の物質118をインクジェット方式にて供給する。

このインクジェット方式による第2の物質118の供給は、前述した実施例と同じく図5Aに示すような分注装置30を使用することができる。

特に、分注装置30は、後述するように、キャブチャーを含む試料を基板12上に供給する場合にも使用される。この場合は、各マイクロピペット34のキャビティ56内にキャブチャーを含む試料を充填し、更に、キャビティ56の容積の減少によってキャビティ56内の試料がキャビティ56に連通する試料吐出口54から所定速度で吐出され、図12に示すように、マイクロピペット34から吐出された試料が基板112上に供給されて、スポット180として整列固定されたパイオチップ110が作製されることになる。

尚、各マイクロピペット34におけるキャビティ（加圧室）56は、上述の第2の物質118や試料が移動するような流路寸法に形成されており、その材質は、第2の物質118や試料と親和性のよいセラミックスからなることが好ましい。

次に、この分注装置30を使って基板本体114上に第2の物質118及び試料を供給する方法の一例について図15を参照しながら詳しく説明する。

図15に示すように、表面に第1の物質116が形成されたガラス基板本体114を複数枚、例えば20枚のガラス基板本体114を、ガラス固定治具210に固定する。次に、このガラス固定治具210と相対位置制御しながら、ガラス基板本体114上を自在に移動できるようにロボットに取り付けられた分注装置30の各チューブ（図示せず）からそれぞれ固定治具36の導入孔104を介して各マイクロピペット34のキャビティ56内に第2の物質118を充填し、アクチュエータ部58を駆動させて、図14Bに示すように、基板本体に形成された第1の物質上のうち、スポット180が形成されるべき箇所以外の部分に第2の物質118を吐出供給させる。

この場合、図5Aに示す10個のマイクロピペット34を全て用いて第2の物質118を供給してもよいが、供給領域の形状の安定性を優先し、1個のマイク

ロビベット34を用いて全ての供給を行う。

次いで、予めマイクロビベット34内を脱泡処理した純水等の置換液で充填し、別の分注装置30を用意し、キャプチャーを含む試料14を試料注入口52から注入した後、アクチュエータ部58を駆動させ置換液を吐出排出し、試料14

置換が完了した段階で、アクチュエータ部58を駆動させて、図13に示すように、試料14を同じガラス固定治具210にセットした基板本体114上のうち、スポット180を形成すべき部分、即ち、第1の物質116が露出している部分に吐出供給させる。このようにして、図12に示すように、基板112上に試料14によるスポット180が多数配列されたバイオチップ110が作製される。

このように、第5の実施の形態に係るバイオチップ110及びその製造方法においては、前記基板本体114上の全面に、キャプチャーの基板112上への固定化を担う第1の物質116を形成し、基板本体114上に形成された第1の物質116上のうち、スポット180が形成されるべき箇所以外の部分に、キャプチャーの基板112上への固定化を阻害し、かつ、前記被検体が基板112上への付着を阻害する第2の物質118を形成するようにしたので、第2の物質118が形成されていない部分の形状により、スポット180の形状並びに配列形態が決定されることになる。

そのため、試料を基板112上に供給した際に、スポット180の配列間隔がばらついたり、スポット180同士が付着するなどの不具合は生じなくなる。しかも、試料を規定の位置に供給できなかった場合には、第2の物質118の存在により、該試料の基板112上への付着が回避されるため、汚染源となることはない。

また、試料をインクジェット方式で供給した場合に、試料吐出の際にしばしば発生するサテライト現象による飛沫は、第2の物質118の存在によって基板112への付着が阻害されるため、インクジェット方式にて発生していたサテライトの問題を解消させることができる。

つまり、この第5の実施の形態においては、安価に高品質なバイオチップ11

0を得ることができ、バイオチップ110の製造工程の簡略化、コストの低廉化並びに歩留まりの向上を図ることができる。

上述の第5の実施の形態では、分注装置30を用いてインクジェット方式で第2の物質118を供給した例を示したが、その他、第2の物質118をスクリーン印刷法で形成するようにしてもよい。この場合、スポット180が形成されるべき箇所以外の部分への第2の物質118の供給時間を短縮することができ、スループットの向上及び工数の削減化を図ることができる。

その他の方法としては、第2の物質118をディッピング法で形成するようにしてもよい。この場合、例えば図16Aに示すように、基板本体114上に形成された第1の物質116上のうち、スポット180が形成されるべき箇所に、レジスト212を形成する。その後、図16Bに示すように、レジスト212を含む全面に第2の物質118をディッピング法で形成する。その後、図16Cに示すように、レジスト212をリフトオフする。これによって、スポット180が形成されるべき箇所以外の部分に、第2の物質118が形成されることになる。

このディッピングによる方法は、第2の物質118が粘度の低い場合に好適であり、この場合も、スポット180が形成されるべき箇所以外の部分への第2の物質118の供給時間を短縮することができ、スループットの向上及び工数の削減化を図ることができる。

なお、この発明に係るバイオチップ及びその製造方法は、上述の実施の形態に限らず、この発明の要旨を逸脱することなく、種々の構成を採り得ることはもちろんである。



請求の範囲：

1. 被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャーを含む試料を複数種類、基板上に供給して、該基板上にキ

- 5 ヤプチャーを含む試料によるスポットが多数配列されたバイオチップにおいて、  
前記基板は、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質が形成されていることを特徴とするバイオチップ。

- 10 2. 請求項1記載のバイオチップにおいて、  
前記固定化を担う第1の物質が、キャプチャーを含まない溶液試料であって、前記キャプチャーを前記基板上に固定化させるための固定化液であることを特徴とするバイオチップ。

- 15 3. 請求項1記載のバイオチップにおいて、  
前記固定化を担う第1の物質が、キャプチャーを含まない溶液試料であって、前記キャプチャーを前記基板上に固定化を補強する固定化補強液であることを特徴とするバイオチップ

- 20 4. 請求項1記載のバイオチップにおいて、  
前記基板は、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質が形成され、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、少なくとも前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害する第2の物質が形成されていることを特徴とするバイオチップ。

- 25 5. 請求項4記載のバイオチップにおいて、  
前記第2の物質は、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害し、かつ、前記被検体の前記基板上への付着を阻害する物質であることを特徴とするバイオチップ。

6. 請求項4記載のバイオチップにおいて、

前記第1の物質は、前記基板上の全面に形成され、

前記第2の物質は、前記基板上に形成された前記第1の物質上のうち、前記ス

5 ポットが形成されるべき箇所以外の部分に形成されていることを特徴とするバイオチップ。

7. 被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用  
いられるキャプチャーを含む試料を複数種類、基板上に供給して、該基板上にキ  
ャプチャーを含む試料によるスポットが多数配列されたバイオチップを製造する  
10 バイオチップの製造方法において、

キャプチャーを含む溶液試料とキャプチャーを含まない溶液試料とをそれぞれ  
別々に供給してバイオチップを製造することを特徴とするバイオチップの製造方  
法。

8. 請求項7記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーを含む溶液試料をインクジェット方式で供給することを特徴  
とするバイオチップの製造方法。

9. 請求項7記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーを含まない溶液試料をインクジェット方式で供給することを特  
徴とするバイオチップの製造方法。

10. 請求項7記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーを含まない溶液試料をスクリーン印刷方式にて供給することを  
特徴とするバイオチップの製造方法。

11. 請求項7記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーを含まない溶液試料は、前記キャプチャーを前記基板上に固

定化させるための固定化液、又は前記キャプチャーの前記基板上への固定化を補強する固定化補強液であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

1 2. 請求項 1 1 記載のバイオチップの製造方法において、

- 5 前記固定化液又は前記固定化補強液は、前記キャプチャーを含む溶液試料と混合することにより、固定化又は固定化補強が進む液であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

1 3. 請求項 1 1 記載のバイオチップの製造方法において、

- 10 前記基板上に前記キャプチャーを含む溶液試料を供給した後、該試料が供給された部分に前記固定化液、若しくは前記固定化補強液を供給することを特徴とするバイオチップの製造方法。

1 4. 請求項 1 1 記載のバイオチップの製造方法において、

- 15 前記基板上に前記固定化液若しくは該固定化補強液を供給した後、該固定化液若しくは該固定化補強液が供給された部分に前記キャプチャーを含む溶液試料を供給することを特徴とするバイオチップの製造方法。

1 5. 請求項 1 1 記載のバイオチップの製造方法において、

- 20 前記基板上に前記固定化液若しくは前記固定化補強液と、前記キャプチャーを含む溶液試料とを略同時期に供給することを特徴とするバイオチップの製造方法。

1 6. 請求項 7 記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーは、核酸類であることを特徴とするバイオチップの製造方法

1 7. 請求項 1 6 記載のバイオチップの製造方法において、

前記核酸類が、DNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、cDNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、RNAまたはアンチセンスRNA及びまたはその断片もしくは増幅されたもの、化学合成されたDNAもしくは増

幅されたもの、または、化学合成されたRNAもしくは増幅されたものであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

18. 請求項7記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーが、蛋白質類であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

19. 請求項18記載のバイオチップの製造方法において、

前記蛋白質類が、抗原、抗体、レクチン、アドヘシン、生理活性物質の受容体、またはペプチドであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

20. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

前記固定化液がポジティブチャージを持った化学物質溶液であり、イオン結合により前記キャプチャーを固定化することを特徴とするバイオチップの製造方法。

21. 請求項20記載のバイオチップの製造方法において、

前記化学物質が $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン等のシランカップリング剤、ポリーL-リジン、あるいはポリアルキルアミンであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

22. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

前記固定化液が基板表面を化学修飾する化学物質であり、基板表面に導入された官能基と前記キャプチャーを修飾して導入した官能基を化学反応させ、共有結合によりキャプチャーと基板を固定化することを特徴とするバイオチップの製造方法。

23. 請求項22記載のバイオチップの製造方法において、

前記化学反応が、アミノ基とアルデヒド基との反応、アミノ基とN-ヒドロキシサクシイミド基との反応、アミノ基とカルボキシル基との反応、アミノ基とエ

ポキシ基との反応、または、チオール基とエポキシ基との反応であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

24. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

- 5 前記固定化液が、アビジン、ストレプトアビジン、プロタミンあるいはヒストンであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

25. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

- 10 前記固定化液が、フェニル基、アルキル基等の疎水基を含む溶液であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

26. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

15 前記固定化補強液が、保水性物質であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

27. 請求項26記載のバイオチップの製造方法において、

前記保水性物質が、コロミン酸、ヒアルロン酸、またはコロミン酸とヒアルロン酸の混合物であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

- 20 28. 請求項14記載のバイオチップの製造方法において、

前記固定化補強液が、高分子物質であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

29. 請求項28記載のバイオチップの製造方法において、

- 25 前記高分子物質が、CM-セルロース、ニトロセルロース、ポリアクリル酸、アルギン酸等の酸性ポリマー、あるいは、ポリエチレンイミン、ポリアクリルアミド等の塩基性ポリマー、あるいは、メチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等の中性ポリマー、または、BSA、卵白アルブミン、リゾチーム等の蛋白質類であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

30. 請求項11記載のバイオチップの製造方法において、

前記基板が複数枚セットされた治具を備え、前記キャプチャーを含む溶液試料と前記キャプチャーを含まない溶液試料との供給を前記治具上に固定された状態

5 の基板のまま行うことを特徴とするバイオチップの製造方法。

31. 請求項11記載のバイオチップの製造方法において、

キャプチャーを含まない溶液試料が前記基板上に供給される領域が、前記キャプチャーを含まない溶液試料が供給される領域と略同一又は前記キャプチャーを含む溶液試料が供給される領域を含む領域で、且つ領域の形状が略円形であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

32. 請求項11記載のバイオチップの製造方法において、

キャプチャーを含まない溶液試料が前記基板上に供給される領域が、前記キャプチャーを含まない溶液試料が供給される領域を2つ以上含む大きさであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

33. 被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャーを含む試料を複数種類、基板上に供給して、該基板上にキャプチャーを含む試料によるスポットが多数配列されたバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、

少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を担う第1の物質を有する前記基板上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、少なくとも前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害する第2の物質を形成する工程を有することを特徴とするバイオチップの製造方法。

34. 請求項33記載のバイオチップの製造方法において、

前記基板上のうち、少なくとも前記スポットが形成されるべき箇所に、前記第

1 の物質を形成する工程と、

前記基板上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第 2 の物質を形成する工程とを有することを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 3 5. 請求項 3 4 記載のバイオチップの製造方法において、

前記基板上の全面に前記第 1 の物質を形成する工程と、

前記基板上に形成された前記第 1 の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第 2 の物質を形成する工程とを有することを特徴とするバイオチップの製造方法。

10

3 6. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記基板として、予め前記スポットが形成されるべき箇所に、前記第 1 の物質が形成された基板を用い、

15 前記基板上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第 2 の物質を形成する工程を有することを特徴とするバイオチップの製造方法。

3 7. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 2 の物質は、前記キャプチャーの前記基板上への固定化を阻害し、かつ、前記被検体の前記基板上への付着を阻害する物質であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

20

3 8. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーを含む試料をインクジェット方式で供給することを特徴とするバイオチップの製造方法。

25

3 9. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 2 の物質を、インクジェット方式で供給することを特徴とするバイオチップの製造方法。

40. 請求項33記載のバイオチップの製造方法において、

前記第2の物質を、スクリーン印刷法で形成することを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 41. 請求項33記載のバイオチップの製造方法において、

前記第2の物質を、ディッピング法で形成することを特徴とするバイオチップの製造方法。

42. 請求項41記載のバイオチップの製造方法において、

10 前記基板上に形成された前記第1の物質上のうち、前記スポットが形成されるべき箇所に、レジストを形成し、

前記レジストを含む全面に前記第2の物質をディッピング法で形成し、

前記レジストをリフトオフして、前記スポットが形成されるべき箇所以外の部分に、前記第2の物質を形成することを特徴とするバイオチップの製造方法。

43. 請求項33記載のバイオチップの製造方法において、

前記第1の物質が、ポジティブチャージを有する化学物質であって、イオン結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合に、

第2の物質は、ネガティブチャージを有する化学物質であることを特徴とする

20 バイオチップの製造方法。

44. 請求項43記載のバイオチップの製造方法において、

前記第1の物質は、少なくともγ-γ-アミノプロピルトリエトキシシラン等のシランカップリング剤、ポリ-L-リジン、ポリエチレンイミン、あるいはポリアルキルアミンを含み、

25 前記第2の物質は、少なくともコハク酸、グルコン酸等の有機酸類あるいはポリアクリル酸、アルギン酸等の高分子酸類を含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。



4 5. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 1 の物質が、活性化基を有し、基板表面を修飾する化学物質であって、基板表面に導入された活性化基と前記キャプチャーを修飾して導入した官能基とを化学反応させ、共有結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合

5 に、

前記第 2 の物質は、活性化基と反応する官能基を有する化学物質であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

4 6. 請求項 4 5 記載のバイオチップの製造方法において、

10 前記共有結合を達成する化学反応が、アミノ基とアルデヒド基との反応、アミノ基とN-ヒドロキシサクシニミド基との反応、アミノ基とカルボキシル基との反応、アミノ基とエポキシ基との反応、又は、チオール基とエポキシ基との反応であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

4 7. 請求項 4 5 記載のバイオチップの製造方法において、

15 前記第 1 の物質は、少なくともγ-アミノプロピルトリエタキシランとグルタルアルデヒドとの混合物、γ-アミノプロピルトリエタキシランと無水コハク酸とN-ヒドロキシサクシニミドとの混合物、γ-アミノプロピルトリエタキシランと無水コハク酸との混合物、エピクロロヒドリン、あるいはビスオキシシランを含み、

20 前記第 2 の物質は、少なくともアミノ酸類、アミノ基を有するトリス、エタノールアミン、チオール基を有するシステイン、グルタチオン、あるいはチオブライコールを含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

4 8. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 1 の物質が、基板表面を修飾する化学物質であって、アフィニティ結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合に、

前記第 2 の物質は、該化学物質とアフィニティ結合する物質であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

4 9. 請求項 4 8 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 1 の物質は、少なくともアビジン、ストレプトアビジン、プロタミン、ヒストン、ビオチン、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体を含み、

- 5 前記第 2 の物質は、少なくともアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、核酸、抗原、抗体結合蛋白質、あるいは抗体を含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 0. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

- 10 前記第 1 の物質が、スチレン基、フェニル基、アルキル基等の疎水基を含み、基板表面を修飾する化学物質であって、疎水結合により前記キャプチャーの基板への固定化を担う場合に、

前記第 2 の物質は、少なくとも両親媒性物質を含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 1. 請求項 5 0 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 1 の物質は、少なくともポリスチレンあるいはアルキルベンゼンを含み、

前記第 2 の物質は、少なくともゼラチンあるいはカゼインを含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 2. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 2 の物質は、撥水性を有する物質よりなることを特徴とするバイオチップの製造方法。

- 25 5 3. 請求項 5 2 記載のバイオチップの製造方法において、

前記第 2 の物質は、少なくともシリコンあるいはフッ素を含むことを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 4. 請求項 3 3 記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーは核酸類であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 5. 請求項5 4記載のバイオチップの製造方法において、

前記核酸類が、DNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、cDNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、RNA又はアンチセンスRNA及び／又はその断片もしくは増幅されたもの、化学合成されたDNAもしくは増幅されたもの、又は、化学合成されたRNAもしくは増幅されたものであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

10 5 6. 請求項3 3記載のバイオチップの製造方法において、

前記キャプチャーが、蛋白質類であることを特徴とするバイオチップの製造方法。

5 7. 請求項5 6記載のバイオチップの製造方法において、

前記蛋白質類が、抗原、抗体、レクチン、アドヘシン、生理活性物質の受容体、又はペプチドであることを特徴とするバイオチップの製造方法。

## 要 約

- 被検体と特異に反応し、被検体の構造又は機能に対する情報を得るために用いられるキャプチャーを複数種類、基板 10 上に供給して、該基板 10 上にキャプチャーによるスポットが多数配列されたバイオチップを製造するバイオチップの製造方法において、基板 10 上に固定化補強液 16 を供給し（第 1 の供給工程）、次いで、試料調製工程で得られた試料 14 を基板 10 上に供給されている固定化補強液 16 上に供給することによって、バイオチップを製造する（第 2 の供給工程）。